

# From polarity in flies to hearts in mice : the wnt-frizzled cascade in cardiac wound healing

## Citation for published version (APA):

van Gijn, M. E. (2001). From polarity in flies to hearts in mice : the wnt-frizzled cascade in cardiac wound healing. Maastricht: Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2001

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

The wnt-fz cascade is known to be involved in architectural control during development in *Drosophila*. In mammals the cascade plays an important role in several developmental and pathological processes diverging from organogenesis to cancer and Alzheimer's disease. In this thesis we have focussed on the role for the wnt-fz cascade in cardiac development and wound healing after MI, processes that require architectural control.

In the **first chapter** the wound healing process after MI was explained and the wnt-fz cascade was introduced. Furthermore, the role of the cascade in cardiac development and after MI was reviewed.

In a previous study we have demonstrated that fz2 expression was upregulated in the myofibroblasts during their migration and proliferation into the infarct area. In **chapter 2** we studied the expression of the different members of the fz receptor and FRP families. We demonstrated the upregulation of the fz1, 2 and 7 and the FRP1, 2 and 3 gene expression seven days after MI in mice. Furthermore, we demonstrated that, like in rats, the fz2 expression in mice was localized to the borderzone of the infarct area 7 days after MI.

In **chapter 3** we studied if the family of frizzled receptors, apart from during the migration and proliferation of myofibroblasts after MI, was also expressed in another highly organized proliferation/migration process, such as the proliferation and migration of epithelial cells in the crypt-villus units of rat and mouse intestine. We demonstrated that in the mouse intestine fz1-7 were expressed and that the expression of fz2 was predominantly localized in the crypts. Furthermore, an antibody was produced against the third extracellular loop of fz2 in order to study the receptor at the protein level. The fz2 protein was localized at the membrane of the villus epithelial cells. The presence of fz2 expression in this highly organized cellular proliferation and migration model suggests that fz2 expression is not unique for migrating cardiac myofibroblasts, but is a more general phenomenon in proliferating and migrating cells.

Genes that have a role during cardiac development often are re-expressed in the heart after MI. Furthermore, the wnt-fz cascade has been associated with neural crest cell proliferation and early migration during development in mammals. To investigate whether fz2 can be associated with the process of cardiac morphogenesis, we studied its expression in the thoracic arterial system and heart of mouse embryos of 10, 12, 14, 16 and 18 days after conception by means of in situ hybridization (**chapter 4**). At day 10 after conception, fz2 was expressed in the pharyngeal arches and arch arteries. The outflow tract, the ascending aorta and the pulmonary trunk were positive for fz2 from day 12 on. This expression decreased over time and at day 18 only some signal could be detected in the aorta and pulmonary trunk. In contrast, in coronary and pulmonary arteries no expression was observed at any time point. Our results indicate that there is transient expression of fz2 in areas that are invaded by neural crest cells. This expression is downregulated upon neural crest cell differentiation. The fz2 expression supports a role for the wnt-fz pathway in neural crest cell migration.

In **chapter 5** the possible signal transduction pathways for fz2 in the myofibroblasts were investigated. Several signal transduction pathways for these receptors have been described, although the picture is still far from complete. The expression of several possible signal transduction molecules for the fz2 receptor, like dvl,  $\beta$ -catenin, cdc42, and P-JNK were studied by immunohistochemistry and in situ hybridization. We were not able to demonstrate  $\beta$ -catenin, P-JNK or cdc42 in the myofibroblasts after MI. However, dvl1 expression could be demonstrated in the myofibroblasts. The co-expression of dvl1 and fz2 in the myofibroblasts during their migration into the infarct area suggests that a wnt-fz signal transduction route is activated.

Recently, modulation of the wnt-fz cascade has been related to apoptosis. To elucidate the role of this cascade in apoptosis, we studied the effects of overexpression of fz1, fz2, dvl1 and  $\beta$ -catenin (**chapter 6**). The signal transduction pathway and the involvement of  $\beta$ -catenin were further investigated by using different inhibitors of the wnt-fz pathway. Overexpression of fz1, fz2 and dvl1 induced apoptosis in COS7 and 293 cells.  $\beta$ -Catenin appears to be the mediator for this process since  $\beta$ -catenin overexpression as well as lithium and valproate, which inhibit  $\beta$ -catenin degradation, induced apoptosis. In contrast, lithium treatment did not result in apoptosis in PC12 cells. We conclude that different components of the wnt-fz cascade can induce apoptosis, but that this effect is dependent on the cell type.

In **chapter 7** we studied a possible model for the involvement of the wnt-fz cascade in cell alignment. Fz2 is expressed in myofibroblasts during their migration and alignment in the granulation tissue formed in the infarct area after MI. Myofibroblasts can be found in the granulation tissue aligned in parallel with the epi- and endocardium. This alignment is likely to contribute to the development of a strong scar. So far, little attention has been given to the alignment process. In an in vitro study, where fibroblasts align in a similar way as is observed in the myofibroblasts after MI, the role for the fz signal transduction pathway in the alignment process was investigated. The fzs that are upregulated in the area of infarction after MI were also expressed in the fibroblasts in the alignment assay. By adding several inhibitors it was shown that two of the proposed signal transduction pathways for fz, GSK-3 $\beta$  and G $_i$ -proteins, were most likely not involved in the alignment process. The results obtained in this study are not conclusive for an involvement of the wnt-fz cascade in the fibroblast alignment.

Neovascularization is an important process after MI, to restore the blood supply to the infarct area. In **chapter 8**, we demonstrated an upregulation of  $\beta$ -catenin in the vascular endothelial cells at 4 and 7 days after MI, whereas at later time points only few cells were positive. In contrast, vessels in the surviving myocardium did not express  $\beta$ -catenin at any time point. Dvl1 was also expressed in endothelial cells of remodeling vessels around the infarct. The  $\beta$ -catenin and dvl1 co-expression in the endothelial cells suggests that a wnt-fz signal transduction pathway is functional during their migration and proliferation. This observation

suggests a link between  $\beta$ -catenin and neovascularization.

In **chapter 9** we investigated the role for *dv11* in the wound healing process after MI, by inducing MI in mice lacking the *dv11* gene. The hearts of most *dv11*<sup>-/-</sup> mutant mice ruptured during the first week after MI. There was a negative association between the cardiac ruptures and  $\beta$ -catenin levels in the intercalated disc between the cardiomyocytes. This finding demonstrated that MI in the *dv11* knockout mice provides a model for cardiac rupture, associated with defects in cell-cell interactions. Furthermore, we demonstrated that the wnt-fz cascade does not only regulate cytoplasmic  $\beta$ -catenin, involved in gene transcription regulation, but also the  $\beta$ -catenin in the adherens junctions.

In **chapter 10** the experimental chapters are discussed and put into a broader context. We conclude that we have found evidence that the wnt-fz cascade is involved in infarct healing after MI. This cascade has also been implicated in other cardiovascular diseases. Therefore novel intervention strategies could be designed that target components of the wnt-fz cascade and that lead to new therapeutic agents to treat cardiovascular disease.



## Samenvatting

Frizzled genen en de wnt-fz cascade hebben in de fruitvlieg een belangrijke rol in de rangschikking van cellen, hetgeen ook wel architectuurcontrole genoemd wordt. Gebleken is dat de wnt-fz cascade in zoogdieren geconserveerd is en een belangrijke rol heeft in de embryonale ontwikkeling en verschillende pathologische processen, zoals kanker en de ziekte van Alzheimer. Architectuur is ook belangrijk voor de functie van het hart. Door een hartinfarct wordt de architectuur van het hart aangetast, wat gevolgen heeft voor de hartfunctie. Als gevolg van een hartinfarct kan namelijk dilatatie van het ventrikel plaatsvinden, hetgeen in veel gevallen leidt tot hartfalen. Er is weinig bekend over genen die betrokken zijn bij de controle van de ventrikelarchitectuur. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft zich voornamelijk gericht op de rol van de wnt-fz cascade in de ontwikkeling van het hart en in de wondgenezing van het hart na een hartinfarct.

In het **eerste hoofdstuk** wordt het wondgenezingsproces in het hart na een hartinfarct beschreven. Voorts wordt de wnt-fz cascade geïntroduceerd en wordt beschreven wat tot nu toe bekend is over de rol van deze cascade in hartontwikkeling en hart- en vaatziekten.

In een voorgaande studie in ratten werd reeds een verhoogde expressie van fz2 in de myofibroblasten aangetoond gedurende hun proliferatie en migratie naar het infarctgebied. Nadat de cellen waren aangekomen in het infarctgebied en parallel aan het epi- en endocard gerangschikt waren, nam de fz2 expressie weer af.

In het **tweede hoofdstuk** van dit proefschrift werd, in de muis, bestudeerd welke frizzleds en aan frizzled gerelateerde eiwitten (FRPs) tot expressie komen in het hart na een hartinfarct. Uit de resultaten bleek dat 7 dagen na het hartinfarct de expressie van fz1, fz2, fz7, FRP1, FRP2 en FRP3 verhoogd was. Verder werd aangetoond dat de expressie van fz2 in muizen, net als in ratten, was gelokaliseerd in het randgebied van het infarct.

In het onderzoek dat in **hoofdstuk 3** beschreven wordt, werd bestudeerd of fz2, behalve bij migrerende myofibroblasten, ook bij andere georganiseerde celmigratie-processen is betrokken. De migratie van epitheelcellen in de dunne darm vanuit de crypten naar de top van de darmvlokken is een dergelijk georganiseerd proces. Daarom hebben we de expressie van verschillende leden van de frizzled familie bestudeerd in de dunne darm van de muis. Uit deze studie bleek dat fz1 tot en met fz7 tot expressie komen in de dunne darm van de muis. De expressie van fz2 was voornamelijk waar te nemen in de epitheelcellen in de crypten van de dunne darm. Vervolgens werd met behulp van een polyclonaal antilichaam, gericht tegen een deel van de fz2 receptor, de lokalisatie van de receptor zelf aangetoond in de epitheelcellen van de darmvlokken. Uit bovenstaande experimenten concludeerden we dat fz2 in twee modellen van georganiseerde celmigratie tot expressie komt. Hieruit blijkt dat de associatie tussen fz2 en celmigratie niet beperkt blijft tot myofibroblasten, maar een meer algemeen fenomeen is voor migrerende cellen.

Genen die een rol hebben tijdens de ontwikkeling van het hart komen vaak opnieuw tot expressie in het hart na een hartinfarct. Verder wordt de wnt-fz

cascade geassocieerd met de migratie en proliferatie van neuraallijstcellen gedurende de embryonale ontwikkeling in zoogdieren. Neuraallijstcellen zijn belangrijk voor de hartontwikkeling. Om te onderzoeken of fz2 geassocieerd mag worden met de ontwikkeling van het hart is, in **hoofdstuk 4**, de expressie van fz2 bestudeerd in het hart en het arteriële systeem in de thorax tijdens de embryonale ontwikkeling van de muis met behulp van in situ hybridisatie. Tien dagen na conceptie werd signaal gezien in de kieuwbogen en kieuwboogarteriën. Het uitstroomgebied van het hart, het stijgende gedeelte van de aorta en de stam van de longslagader waren vanaf dag 12 positief voor fz2 expressie. Deze expressie nam af met de tijd en 18 dagen na de conceptie werd alleen nog signaal in de aorta en de stam van de longslagader waargenomen. Daarentegen werd op geen enkel tijdstip expressie waargenomen in de longslagaders zelf en in de kransslagaders. Deze resultaten geven aan dat er een tijdelijke expressie van fz2 is in gebieden waar neuraallijstcellen voorkomen. Als de neuraallijstcellen differentiëren neemt de fz2 expressie weer af. Dit expressie-patroon voor fz2 is in overeenstemming met de hypothese dat de wnt-fz cascade een rol speelt in neuraallijstcel migratie en fz2 betrokken is bij de hartontwikkeling.

Er zijn meerdere signaaltransductie routes voor fz2 beschreven. Er zijn echter nog steeds veel onduidelijkheden. In **hoofdstuk 5** werden een aantal van de mogelijke signaaltransductie routes voor de receptor fz2 in de myofibroblasten onderzocht. In deze studie werd de expressie van mogelijke signaaltransductie moleculen zoals dvl,  $\beta$ -catenine, cdc42, en gefosforyleerde JNK (P-JNK) onderzocht met behulp van immunohistochemie en in situ hybridisatie. Er werd in de myofibroblasten geen  $\beta$ -catenine, P-JNK of cdc42 aangetoond. Daarentegen werd wel expressie van dvl1 gevonden. De co-expressie van dvl1 en fz2 in myofibroblastrijke gebieden suggereert dat er een wnt-fz route actief is.

Recentelijk is de wnt-fz cascade gerelateerd aan apoptose (geprogrammeerde celdood). Om dit verband verder op te helderen werden in **hoofdstuk 6** de genen die coderen voor fz1, fz2, dvl1 en  $\beta$ -catenine getransfecteerd in gekweekte cellen om het effect van expressie op apoptose te onderzoeken. Daarnaast is de betrokkenheid van  $\beta$ -catenine verder onderzocht met behulp van verschillende farmacologische remmers. In deze studie werd aangetoond dat verhoogde expressie van fz1, fz2 en dvl1 tot apoptose leidde in COS7 en 293 cellen. Vervolgens leek  $\beta$ -catenine betrokken te zijn bij apoptose omdat zowel expressie van  $\beta$ -catenine zelf, als het remmen van de afbraak van  $\beta$ -catenine tot apoptose leidde. Het remmen van de afbraak van  $\beta$ -catenine had daarentegen geen effect op PC12 cellen. Uit deze experimenten concluderen we dat verschillende leden van de wnt-fz cascade apoptose kunnen bewerkstelligen maar dat het effect afhankelijk is van het type cel.

Vervolgend werd in **hoofdstuk 7** een andere mogelijke functie van de wnt-fz cascade bestudeerd. Zoals bovenstaand beschreven komt fz2 tot expressie in myofibroblasten tijdens hun migratie in het infarctgebied. Als deze cellen parallel liggen met het epi- en endocard neemt de expressie weer af. Gedacht wordt dat de rangschikking van myofibroblasten bijdraagt aan de ontwikkeling van een sterk

litteken. De mogelijke rol van de wnt-fz cascade in de fibroblast-rangschikking werd bestudeerd in een celcultuurstudie, waarin fibroblasten zich op een zelfde manier rangschikken als in het litteken na een hartinfarct. In de fibroblasten in celkweek kwamen verschillende frizzleds tot expressie. Remming van twee mogelijke signaal transductie routes van frizzled had echter geen invloed op de rangschikking van de cellen. Uit deze resultaten kunnen we geen conclusies trekken met betrekking tot de betrokkenheid van de wnt-fz cascade in de rangschikking van de fibroblasten.

Neovascularisatie is een belangrijk proces in een helend infarct. Het zorgt ervoor dat de bloedvoorziening naar het weefsel hersteld wordt. In **hoofdstuk 8** hebben we aangetoond dat  $\beta$ -catenine, op 4 en 7 dagen na het hartinfarct, aanwezig is in de vasculaire endotheelcellen in het infarct gebied. In vaatjes in het gezonde hartweefsel werd geen  $\beta$ -catenine waargenomen. In de vasculaire endotheelcellen in het infarctgebied bleek verder ook dvl1 tot expressie te komen. Deze co-expressie van  $\beta$ -catenine en dvl1 in endotheelcellen suggereert een rol voor de wnt-fz cascade in de proliferatie en migratie van deze cellen. Verder wijzen deze resultaten op een associatie tussen  $\beta$ -catenine en neovascularisatie.

In **hoofdstuk 9** werd de rol van dvl1 in het wondgenezingsproces in het hart na een hartinfarct onderzocht. Daarvoor hebben we muizen gebruikt, die het gen dat codeert voor dvl1 missen. De harten de meeste van deze muizen ruptuureerden in de eerste week na het hartinfarct, hetgeen geassocieerd bleek te zijn met de afwezigheid van detecteerbaar  $\beta$ -catenine in de intercallair schijven tussen de levende hartspiercellen. Deze gegevens tonen aan dat dit hartruptuur model is geassocieerd met een defect in celinteracties. Verder tonen deze gegevens aan dat de wnt-fz cascade niet alleen het  $\beta$ -catenine in het cytoplasma reguleert, dat betrokken is bij de regulatie van gentranscriptie, maar ook het  $\beta$ -catenine aan de plasmamembraan.

Tenslotte zijn in **hoofdstuk 10** de experimentele data bediscussieerd en in een bredere context geplaatst. We concluderen dat met het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, aanwijzingen gevonden zijn voor een relevante rol van de wnt-fz cascade in de cardiale wondgenezing. In de toekomst zal met behulp van selectieve interventies, die ingrijpen op de wnt-fz cascade, dit mechanisme verder ontrafeld kunnen worden. Aangezien deze cascade ook betrokken is bij andere hart- en vaatziekten zouden interventies gericht op de wnt-fz cascade tot nieuwe therapieën voor hart-en vaatziekten kunnen leiden.